科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２６　年　　５　月　２３　日現在

機関番号：　１１３０１
研究種目：　若手研究(B)
研究期間：　2012～2013
課題番号：　２４７９１１３２

研究課題名（和文）円形脱毛症発症機序の免疫学的解析

研究課題名（英文）Immunological analysis of alopecia areata

研究代表者
水芦　政人（Mizuashi, Masato）

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：２０４００３６９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,100,000円、（間接経費）　　930,000円

研究成果の概要（和文）：円形脱毛症の脱毛斑部の生検検体を用いて、Th1型、Th2型、Th17型、Treg型のいずれの免疫反応が有意に引き起こされているかを免疫組織学的に検討した。円形脱毛症病変部における炎症性サイトカインとその関連分子の発現は、RT-PCR法による遺伝子発現検索と免疫組織染色による分子発現局在の検討を行った。
円形脱毛症の発症機序解析のための組織学的検討からは、Th1/Th17系の組織学的反応が円形脱毛症病変部で起こっていることを示唆した。本研究での免疫系への臨床的影響と病理学的検討は、円形脱毛症病態の一側面を示したと考える。

研究成果の概要（英文）：T helper 17 cells, characterized by interleukin-17 (IL-17) production, play a critical role in the pathogenesis of autoimmune disease, including alopecia areata (AA). We employed immunohistochemical staining for IL-17-producing cells, as well as interferon-gamma-producing cells, granulysin-bearing cells and Foxp3+ regulatory T cells, and performed a quantitative analysis of IL-17-producing cells in the lesional skin of several clinical forms of AA by TissueFAXS analysis. Among them, interestingly, the ratio of IL-17-producing cells in acute, diffuse and total alopecia was significantly lower than those of multiple types of AA. Our study sheds light on one of the possible immunological mechanisms of AA.

研究分野：　医歯薬学

科研費の分科・細目：　内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：　円形脱毛症　Th17

１．研究開始当初の背景

円形脱毛症は頭髪または眉毛、髭、体幹や四肢等の体毛に脱毛をきたす後天性脱毛症である。病理組織学的に、円形脱毛症の急性期には成長期毛の毛球部周囲のリンパ球を主体とした炎症細胞浸潤を認め、慢性化した脱毛斑では毛包の退縮や減少がみられる。急性期に認める毛球部周囲に浸潤しているリンパ球は、CD4 陽性細胞の比率が高く、CD4:CD8 比は 4:1 とされる。その毛球上皮細胞には MHC class Ⅰ・Ⅱ抗原や ICAM-1 が発現し、脱毛斑部には IFN-γや IL-2 などの Th1 型サイトカインが多いとの報告がある。そのため、円形脱毛症は Th1 型の免疫反応によるものと考えられている。一方で、円形脱毛症患者ではアトピー性皮膚炎や気管支喘息、アレルギー性鼻炎などのいわゆる Th2 病態であるアトピー素因の合併が多いことも報告されている。また、東北大学皮膚科教室の川村らは以前円形脱毛症の上記 4 型の他に acute diffuse total alopecia of female scalp (ADTAFS)として、びまん性型ともいうべき全頭型脱毛の特殊型を報告している。ADTAFS の特徴はその臨床経過にあり、突然に急速進行する全頭のびまん性脱毛を生じ、発症後数ヶ月で全頭脱毛に至る。脱毛完了と同時に新しい毛が生え始め、発症から 4～10 ヶ月で全頭部での発毛からショートヘアの状態まで回復する。この病型の脱毛部は病理組織学的に成長期毛の毛包周囲の炎症性細胞浸潤に含まれる好酸球の割合が、通常の円形脱毛症より高いことを確認している。ADTAFS では、Th2 型の免疫反応でみられる好酸球浸潤が毛包周囲に見られることから、すべての円形脱毛症において Th1 型の免疫反応が主体であるとは言えず、臨床的そして病理学的に更なる検討が必要である。

２．研究の目的

円形脱毛症の治療として行われる局所免疫療法の効果を理解するために、円形脱毛症の病理病態が Th1 型、Th2 型、Th17 型のいずれの免疫反応によって引き起こされているかを解析することを目的とした。そのために円形脱毛症の脱毛斑部の検体を用いて、サイトカインとその関連分子の発現を遺伝子探索と免疫組織学的手法にて検討した。

３．研究の方法

(1)RNA 抽出

皮膚生検組織からの RNA の単離は ISOGEN を使用し、製造会社の取扱説明書に従い行った。得られた total RNA を Reverse transcription reagent を用いて逆転写し、得られた cDNA をテンプレートとして PCR 反応を行った。

(2)Real time RT-PCR

上記の方法で得られた cDNA をテンプレートとして Mx3000P 装置を用いて、real time RT-PCR を行った。Brilliant Ⅱ FAST QPCR Master Mix による TaqMan プローブ法により増幅産物を検出し、増幅曲線分析により増幅産物の確認を行った。定量解析はプライマー毎に検量線を作り、Threshold Cycle（Ct）値からサンプル毎の相対量を求め、内在性コントロールとして L19 (MRPL19) 遺伝子発現量で補正した。

(3)免疫染色（酵素免疫染色法）　2010 年から 2012 年に東北大学病院皮膚科を受診し、視診上、円形脱毛症と診断し、病理組織学的に確定診断を得るために皮膚生検を行った 6 例について、IL-17 の免疫染色を行った。パラフィンブロックを 5μm の厚さに薄切し、湯伸ばししたものをスライドグラスにのせ、一晩乾燥させた。脱パラフィンを行い、内因性ペルオキシダーゼ除去を行った。一次抗体にはヒストファイン SAB-PO(O)を使用し、4℃で一晩反応させた。二次抗体はヒストファイン　シンプルステイン MAX-PO(G)を使用した。次に AEC 発色を行い、Hematoxylin による核染色を行った。毛包周囲と毛嚢内に浸潤する IL-17 陽性細胞数の計測には、HistoFAXS ソフトウエアで画像を取得と HistoQuest ソフトウエアでの解析を用いた。機器マニュアルに従い、組織の細胞質として認識させたい色を手動で拾い上げ、TissueGnostics 社独特のアルゴリズムに基づいて最適化と色分解後、作成されたグレースケール画像を用いて、個々の細胞を識別させた[文献)]。Newfucsin-Mean Intensity（抗 IL-17 抗体免疫染色）と Hematoxylin –Mean Intensity(核染色)を測定し、図にプロットした。プロットした点と画像内の赤褐色に染色した細胞(IL-17 陽性細胞)が一致していることを適宜確認し、IL-17 陽性細胞と判断する Newfucsin-Mean Intensity を設定した。脱毛症病変部と正常頭皮の毛包周囲・毛包内の IL-17 陽性細胞数を一定の Newfucsin-Mean Intensity 以上を示した細胞数としてカウントした。

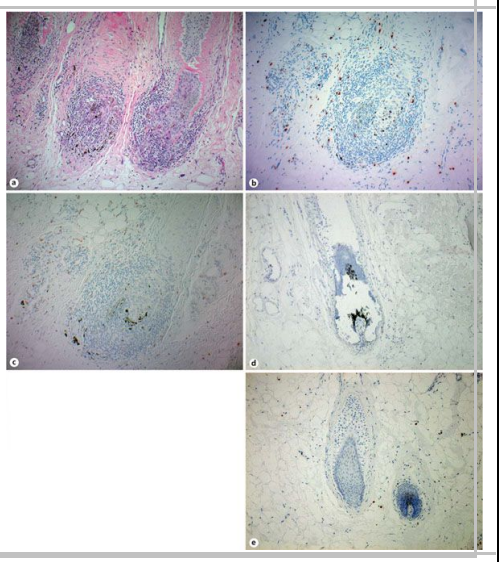
４．研究成果

(1)円形脱毛症の脱毛部における炎症性サイトカイン発現の検討

円形脱毛症の病理病態において、Th1 型、Th2 型、Th17 型のいずれの免疫反応が主たる作用をしているか検討するために、脱毛斑部における T 細胞関連サイトカインと制御性 T 細胞(Treg)関連遺伝子の発現を検討した。Th1 の代表として IFNγ、Th2 サイトカインとして IL-4 と IL-13、Th17 サイトカイン IL-17A と IL-17F、制御性 T 細胞関連分子として IL-10 と Foxp3、炎症性サイトカインと

Case	Sex	Age, years	Duration, months	IL-17+ cells, %	IFN-γ+ cells, n	Clinical types
1	F	54	3	4.08	7	multiple patchy
2	F	25	3	7.25	32	multiple patchy
3	M	41	3	10.37	11	multiple patchy
4	F	34	4	6.69	15	multiple patchy
5	M	33	1	2.21	30	multiple patchy
6	F	36	4	8.60	8	multiple patchy
7	M	54	1	4.28	12	multiple patchy
8	F	62	1	3.78	25	multiple patchy
9	M	50	2	4.30	13	multiple patchy
10	F	47	2	3.60	9	multiple patchy
11	F	22	1	0.88	12	totalis
12	F	24	2	7.14	22	totalis
13	F	31	1	1.25	9	totalis
14	F	43	1	3.54	30	totalis
15	F	46	1	2.25	28	ADTA
16	F	41	1	0.72	15	ADTA
17	M	47	1	1.44	27	ADTA

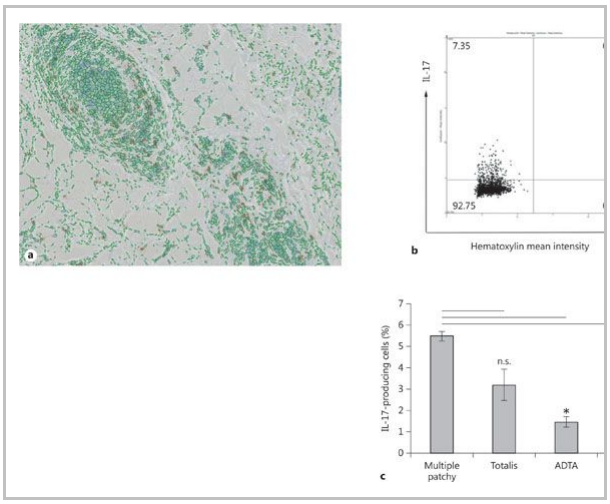
We employed immunohistochemical staining for 10 cases of multiple patchy type, 4 cases of totalis type and 3 cases of ADTA. The ratio of IL-17-producing cells in each group of AA was quantified by TissueFAXS analysis. For the quantification of IFN-γ, the number of IFN-γ-producing cells was manually counted using an ocular grid of 1 cm^2 at a magnification of ×400.



して IL-6 の遺伝子発現を確認した。円形脱毛症の病変部（n = 15)と正常頭皮（n = 3)から RNA を抽出し、逆転写～real-time PCR 法を用いて、IFNγ, IL-6, IL-4, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-10, Foxp3 の遺伝子発現量を検出し、内在性コントロール遺伝子 L19 (MRPL19)の相対比として表した。正常頭皮と脱毛症病変部では、同程度の L19 が検出された. 脱毛症病変部では、調べた IFNγ, IL-6, IL-4, IL-13, IL17A, IL-17F, IL-10, Foxp3 の全ての遺伝子発現が、正常頭皮に比較して有意に高発現していた。それぞれの遺伝子発現を正常頭皮での発現比として検証すると、脱毛症病変部では IFNγの発現が、他の遺伝子 IL-6, IL-4, IL-13、IL-17A、IL-17F、IL-10、Foxp3 よりも有意に高いことが示された（$P < 0.05$）。その他の遺伝子間比較では、明らかな差は認められなかった。これらの結果は、脱毛症病変部では、T 細胞全般に浸潤していること、特に Th1 細胞の影響が高いことを示唆する。

(2)脱毛症病変部での Th17 細胞局在の検討。

脱毛症病変部での IL-17A と IL-17F 遺伝子発現増加の意義を検証するために、脱毛病変部における IL-17 発現細胞の浸潤様式を免疫組織学的に検討した。脱毛病変部の毛包周囲の単球を中心とした浸潤細胞内に IL-17 陽性細胞を認めた。一部では、毛嚢内にも IL-17 陽性細胞の浸潤を認めた。HistoFAXS と



HistoQuest ソフトウエアで、毛嚢から毛包周囲の一定面積内の IL-17 陽性細胞数を計測した。脱毛病変部の毛包周囲組織の IL-17 陽性細胞数は、正常頭皮のそれに比較して有意に増加していた。これらは、Th17 細胞が脱毛病変部において毛包に直接作用していることを示唆する。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線）

〔雑誌論文〕（計　1 件）

Tojo G, Fujimura T, Kawano M, Ogasawara K, Kambayashi Y, Furudate S, Mizuashi M, Aiba S.
Comparison of interleukin-17- producing cells in different clinical types of alopecia areata.
Dermatology. 2013;227(1):78-82.査読有
doi: 10.1159/000353159

６．研究組織

(1)研究代表者

水芦　政人（Mizuashi, Masato）
東北大学・大学病院・助教
研究者番号：20400369